

Биологическая активность новых 1-бензоилзамещенных-6-(метилтио)-4-хлор-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидинов

Офицерова Е. С.

аспирант, кафедра органической химии

Алексеева Л. Н.

к.фарм.н.

Шкляренко А. А.

аспирант, кафедра органической химии

Яковлев И. П.

д.х.н., профессор

*ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург, Россия*

Автор для корреспонденции: Офицерова Екатерина Сергеевна, **e-mail:** OfizerovaES@mail.ru

Финансирование: Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Аннотация

В настоящей статье представлены результаты исследования биологической активности новых синтезированных 1-бензоилзамещенных-6-(метилтио)-4-хлор-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидинов. Острую токсичность 2-арил-6-(метилтио)-4-хлор-2H-пиразоло[3,4-d]пиримидинов определяли экспериментально на нелинейных белых мышах-самцах общей массой 16-20 г. Для экспериментальной оценки анальгезирующей активности использовали модель генерации уксуснокислых «корчей» у мышей самцов. Экспериментально было подтверждено, что синтезированные новые 2-арил-6-(метилтио)-4-хлор-2H-пиразоло[3,4-d]пиримидины нетоксичны и обладают выраженной анальгезирующей активностью.

Ключевые слова: 1-бензоилзамещенные-6-(метилтио)-4-хлор-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидины, биологическая активность, программа PASS, острая токсичность, анальгезирующая активность

doi: 10.29234/2308-9113-2020-8-3-76-84

Для цитирования: Офицерова Е. С., Алексеева Л. Н., Шкляренко А. А., Яковлев И. П. Биологическая активность новых 1-бензоилзамещенных-6-(метилтио)-4-хлор-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидинов. *Медицина* 2020; 8(3): 76-84.

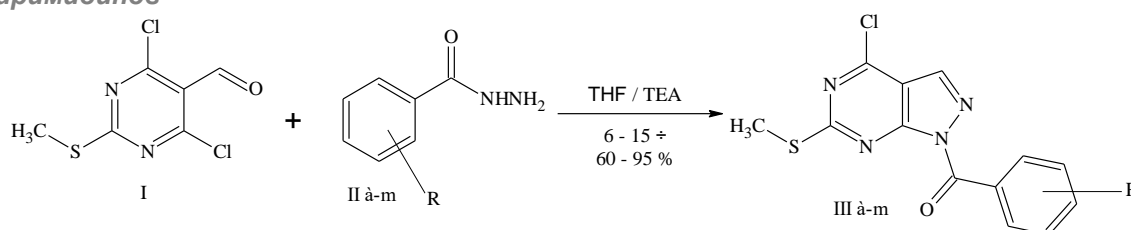
Введение

Пиразолопиримидины представляют собой конденсированные гетероциклические системы, структурно напоминающие производные пуринов [1]. Простейшими представителями данного класса соединений являются Аллопуринол и его метаболит Оксопуринол, активно применяемые в терапии гиперуриемии [2]. Среди пиразолопиримидинов были выявлены вещества, проявляющие противовирусную [3,4], противомикробную [5,6], противовоспалительную [7] активности. В последние несколько

десятилетий интерес к этим соединения продолжает расти благодаря открытию их противоопухолевой активности [8,9]. В связи с этим, авторы приняли решение о поиске новых пиразоло[3,4-*d*]пиримидинов и изучении их биологической активности.

Новые 1-бензоилзамещенные-6-(метилтио)-4-хлор-1*H*-пиразоло[3,4-*d*]пиримидины получали взаимодействием 4,6-дихлор-2*S*-замещенного-пиримидин-5-карбальдегида (I) с замещенным бензгидразидом (IIа-м) в тетрагидрофуране [10] при нагревании перемешивали в течение 6-15 ч. Реакционную массу разбавляли водой и перемешивали. Полученный осадок фильтровали и промывали небольшим количеством воды. Выход продуктов составил 60-95% (схема 1).

Схема 1. Синтез 1-бензоилзамещенных-6-(метилтио)-4-хлор-1*H*-пиразоло[3,4-*d*]пиримидинов



Строение полученных 1-бензоилзамещенных-6-(метилтио)-4-хлор-1*H*-пиразоло[3,4-*d*]пиримидинов доказано физико-химическими методами анализа: ЯМР ^1H , масс-спектрометрией, также была измерена температура плавления соединений IIIа-м (табл. 1).

Таблица 1. ЯМР ^1H , температура плавления и масс-спектрометрия соединений IIIа-н

№	Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- <i>d</i> ₆), δ , м.д.	m/z	Тпл°С
IIIa	2,46 с (3H, CH ₃), 7,59 т (2H, H _{аром} , <i>J</i> = 7,66 Гц), 7,73 т (1H, H _{аром} , <i>J</i> = 7,41 Гц), 7,91 т (2H, H _{аром} , <i>J</i> = 7,28 Гц), 8,68 с (1H, H _{пиразол}).	304,82	130-131
IIIb	2,31 с (3H, CH ₃), 7,53-7,61 м (2H, H _{аром}), 7,72 д (1H, H _{аром} , <i>J</i> = 6,77 Гц), 7,80 д (1H, H _{аром} , <i>J</i> = 7,52 Гц), 8,71 с (1H, H _{пиразол}).	383,59	166-168
IIIc	2,29 с (3H, CH ₃), 2,35 с (3H, CH ₃), 7,34 т (1H, H _{аром} , <i>J</i> = 7,41 Гц), 7,40 д (1H, H _{аром} , <i>J</i> = 7,52 Гц), 7,52 т (2H, H _{аром} , <i>J</i> = 7,1 Гц), 8,68 с (1H, H _{пиразол}).	318,91	143-145
IIId	2,58 с (3H, CH ₃), 3,77 с (3H, OCH ₃), 7,25-7,28 м (2H, H _{аром}), 7,38-7,42 м (1H, H _{аром}), 7,92 д (1H, H _{аром} , <i>J</i> = 8,29 Гц), 8,76 с (1H, H _{пиразол}).	334,81	153-154
IIIe	2,46 с (3H, CH ₃), 3,80 с (3H, OCH ₃), 3,89 с (3H, OCH ₃), 7,13 д (1H, H _{аром} , <i>J</i> = 8,54 Гц), 7,51 с (1H, H _{аром}), 7,60 д (1H, H _{аром} , <i>J</i> = 8,28 Гц), 8,63 с (1H, H _{пиразол}).	364,76	123-125

III f	2,59 с (3H, CH ₃), 7,52-7,58 м (1H, H _{аром}), 7,82-7,86 м (1H, H _{аром}), 7,91-7,97 м (1H, H _{аром}), 8,10-8,15 м (1H, H _{аром}), 8,72 с (1H, H _{пиразол}).	383,61	173-175
III g	2,39 с (3H, CH ₃), 2,60 с (3H, CH ₃), 7,19 д (1H, H _{аром} , J = 7,28 Гц), 7,41-7,47 м (1H, H _{аром}), 7,90-7,94 т (2H, H _{аром} , J = 7,41 Гц), 8,52 с (1H, H _{пиразол}).	318,93	145-147
III h	2,47 с (3H, CH ₃), 3,81 с (3H, OCH ₃), 7,29-7,31 м (1H, H _{аром}), 7,45 с (1H, H _{аром}), 7,47-7,53 м (2H, H _{аром}), 8,68 с (1H, H _{пиразол}).	334,84	150-152
III i	2,60 с (3H, CH ₃), 7,98 д (2H, H _{аром} , J = 8,41 Гц), 8,24 д (2H, H _{аром} , J = 8,53 Гц), 8,85 с (1H, H _{пиразол}).	383,62	187-189
III j	2,43 с (3H, CH ₃), 2,48 с (3H, CH ₃), 7,39 д (2H, H _{аром} , J = 7,78 Гц), 7,83 д (2H, H _{аром} , J = 7,78 Гц), 8,68 с (1H, H _{пиразол}).	318,76	95-97
III k	2,51 с (3H, CH ₃), 3,89 с (3H, CH ₃), 7,13 д (2H, H _{аром} , J = 9,04 Гц), 7,96 д (2H, H _{аром} , J = 8,78 Гц), 8,68 с (1H, H _{пиразол}).	334,77	195-197
III l	2,63 с (3H, CH ₃), 6,86 дд (1H, H _{аром} , J ₁ = 1,51 Гц, J ₂ = 3,51 Гц), 7,85 д (1H, H _{аром} , J = 3,76 Гц), 8,23 с (1H, H _{аром}), 8,70 с (1H, H _{пиразол}).	294,69	123-124
III m	2,65 с (3H, CH ₃), 7,34 т (1H, H _{аром} , J = 4,39 Гц), 8,21 д (1H, H _{аром} , J = 4,77 Гц), 8,34 дд (1H, H _{аром} , J ₁ = 1,13 Гц, J ₂ = 3,89 Гц), 8,74 с (1H, H _{пиразол}).	310,75	135-137

На данный момент в литературе нет упоминания о биологической активности новых 1-бензоилзамещенных-6-(метилтио)-4-хлор-1*H*-пиразоло[3,4-*d*]пиримидинов, поэтому целью данной работы стало изучение биологической активности новых синтезируемых соединений.

Материалы и методы

На 1-м этапе исследования *in vivo* полученных соединений был осуществлен прогноз вероятных видов биологической активности с помощью компьютерной программы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), используя веб-сервис <http://pharmaexpert.ru/passonline>.

Острую токсичность синтезированных 1-бензоилзамещенных-6-(метилтио)-4-хлор-1*H*-пиразоло[3,4-*d*]пиримидинов определяли на нелинейных белых мышах-самцах массой тела 16-20 г по 5 мышей в эксперименте. Животных распределяли на равные части по численности и массе тела в группы, по 10 животных в каждой. Содержание подопытных животных и обращение с ними во время экспериментов соответствовали правилам, принятым в учреждении и установленным требованиям (Приказ МЗ РФ от 01.04.2016 № 199н «Правила надлежащей лабораторной практики»; Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Directive 2010/63/EU).

1-Бензоилзамещенные-6-(метилтио)-4-хлор-1*H*-пиразоло[3,4-*d*]пиримидины вводили однократно, внутрибрюшинно в интервале доз от 1 до 2000 мг/кг в виде суспензии в смеси ДМСО : вода (1:5). Выживаемость животных определяли через 24 и 48 ч от момента введения исследуемого соединения. Наблюдения осуществляли в течение 72 ч. Регистрировали развитие основных симптомов и время гибели животных. Расчет среднесмертельных доз LD₅₀ веществ проводили с помощью экспресс-метода Прозовского В.Б. [11] и пробит анализа по методу Миллера-Тейнтера [12].

Анальгезирующую активность 1-бензоилзамещенных-6-(метилтио)-4-хлор-1*H*-пиразоло[3,4-*d*]пиримидинов устанавливали на модели уксуснокислых «корчей» у мышей-самцов массой 16-20 г. Вещества вводили однократно внутрибрюшинно в дозе 1/10 от LD₅₀, которая составляла 200 мг/кг. Препарат сравнения – метамизол натрия – вводили аналогично в дозе 25 мг/кг. Контрольные животные получали дистиллированную воду. Химическое раздражение вызывали внутрибрюшинным введением 3% раствора уксусной кислоты. Исследуемые соединения вводили за 40 мин до введения уксусной кислоты. Подсчитывали количество корчей у каждой мыши в течение 20 мин.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладной программы Microsoft Excel и экспресс-методом по Прозовскому [11].

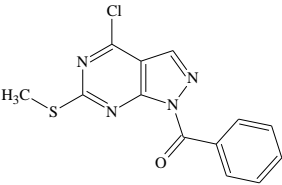
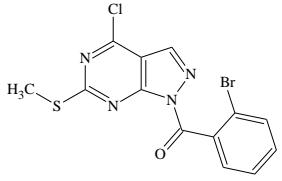
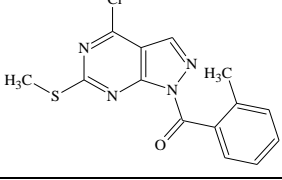
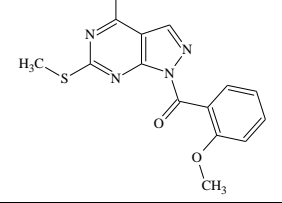
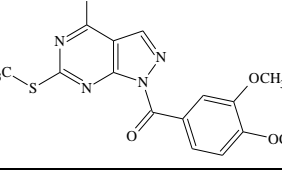
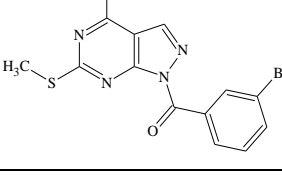
Результаты и обсуждение

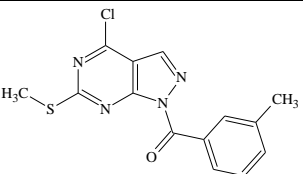
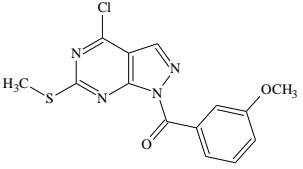
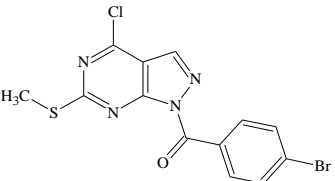
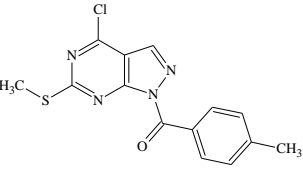
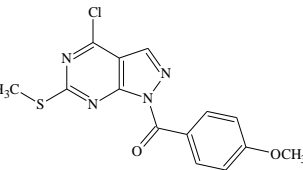
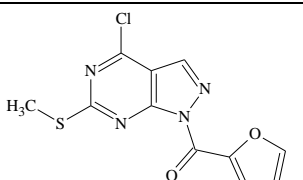
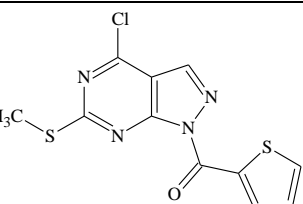
Результаты предварительного скрининга биологической активности, проведенные с помощью программы PASS, показали анальгезирующую активность с вероятностью P_a от 0,2 до 0,4. Дальнейшим этапом работы стало экспериментальное подтверждение данных видов активности.

В экспериментах была установлена острая токсичность при внутрибрюшинном введении. Для 1-бензоилзамещенных-6-(метилтио)-4-хлор-1*H*-пиразоло[3,4-*d*]пиримидинов LD₅₀ составила 2000 мг/кг, поэтому соединения по классификации токсичности препаратов Сидорова К.К. были отнесены к классу практически нетоксичных веществ [13].

При подсчете количества корчей у мышей при установлении анальгезирующей активности оказалось, что полученные 1-бензоилзамещенные-6-(метилтио)-4-хлор-1*H*-пиразоло[3,4-*d*]пиримидины приводят к уменьшению числа судорог у животных на 47-98%, по сравнению с препаратом сравнения метамизолом натрия, активность которого составляет 61 % (табл. 2).

Таблица 2. Анальгезирующая активность 1-бензоилзамещенных-6-(метилтио)-4-хлор-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидинов

Соединение		Доза 1/10 от LD ₅₀ , мг/кг	Время начала судорог, мин	Количество судорог, наблюдаемых в течение 20 мин		Прирост к контролю, %
				Число	%	
Контроль		-	3,8±0,3	101±2	100	-
Метамизол натрия		250	5,2±0,3	39,99±1	38,94	61,06
	IIIa	>2000	2±0,1	20,6±1	20,4	79,6
	IIIб	>2000	4±0,1	22,6±1	22,38	77,62
	IIIв	>2000	1,7±0,2	24,8±1	24,55	75,45
	IIIг	>2000	6±0,3	13,6±2	13,46	86,84
	IIIд	>2000	13,6±0,3	1,2±1	1,19	98,81
	IIIе	>2000	10,4±0,2	10,4±1	10,3	89,7

	IIIж	>2000	0,9±0,1	16±2	15,84	84,16
	IIIз	>2000	5,6±0,4	12,4±1	12,28	87,72
	IIIи	>2000	4,3±0,2	53,3±2	52,77	47,23
	IIIк	>2000	2±0,3	44,4±2	43,96	56,04
	IIIл	>2000	0,8±0,1	10,8±1	10,69	89,31
	IIIм	>2000	7±0,2	14,4±1	14,26	85,74
	IIIн	>2000	1,1±0,1	12,6±1	12,48	87,52

Заключение

Экспериментально показано, что синтезированные новые 1-бензоилзамещенные-6-(метилтио)-4-хлор-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидины по классификации токсичности препаратов Сидорова К.К. относятся к классу практически нетоксичных веществ и обладают выраженной анальгезирующей активностью. Использование компьютерной программы PASS позволило быстро, без существенных экспериментальных затрат,

определить биологическую активность полученных 1-бензоилзамещенных-6-(метилтио)-4-хлор-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидинов.

Литература

1. Chauhan M., Kumar R. Medicinal attributes of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2013. doi: 10.1016/j.bmc.2013.07.027
2. Rashad A.E., Hegab M.I., Abdel-Megeid R.E. et al. Synthesis and anti-HSV-1 evaluation of some pyrazoles and fused pyrazolopyrimidines. *Eur. J. Med. Chem.* 2009; 44(8): 3285. doi:10.1016/j.ejmech.2009.02.012
3. Rashad A.E., Hegab M.I., Abdel-Megeid R.E. et al. Synthesis and antiviral evaluation of some new pyrazole and fused pyrazolopyrimidine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 2008; 16: 7102. doi:10.1016/j.bmc.2008.06.054
4. Holla B.S., Mahalinga M., Karthikeyan M.S. et al. Synthesis of some novel pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivatives as potential antimicrobial agents. *Bioorg. Med. Chem.* 2006; 14: 2040. doi:10.1016/j.bmc.2005.10.053
5. Bakavoli M., Bagherzadeh G., Vaseghifar M. et al. Molecular iodine promoted synthesis of new pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivatives as potential antibacterial agents. *Eur. J. Med. Chem.* 2010; 45: 647. doi: 10.1016/j.ejmech.2009.10.051
6. Trivedi A.R., Dholariya B.H. et al. Synthesis and anti-tubercular evaluation of some novel pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivatives. *Med Chem Res.* 2012; 21:1887–1891. doi: 10.1007/s00044-011-9712-3
7. Rzeski W., Matysiak J., Kandefer-Szerszen M. Anticancer, neuroprotective activities and computational studies of 2-amino-1,3,4-thiadiazole based compound. *Bioorg. Med. Chem.* 2007; 15: 3201. doi: 10.1016/j.bmc.2007.02.041
8. Mavrova A.T., Wesselinova D., Tsenov Y.A., et al. Synthesis, cytotoxicity and effects of some 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives on immunocompetent cells. *Eur. J. Med. Chem.* 2009; 44: 63. doi: 10.1016/j.ejmech.2008.03.006
9. Tamta H. et al. Biochemical characterization of some pyrazolopyrimidine based inhibitors of xanthine. *Biochemistry (Moscow)* 2006; 71: S49-S54. doi: 10.1134/S0006297906130086
10. Патент RU2709018, Российская Федерация, МПК А 61 К 31/519 Производные 1H-пиразоло[3,4-d]пиримидина и способ их получения. Офицера Е.С., Шкляренко А.А., Овсянникова Л.Н., Яковлев И.П. Заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО СПХФА Минздрава России. заявл. 03.04.2017; опубл. 19.12.2017.
11. Прозоровский В.Б. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований. *Психофармакология и биологическая наркология* 2007; 7 (3-4): 2090-2120.
12. Измеров И.Ф., Саноцкий И.В., Сидоров К.К. Параметры токсикометрии промышленных ядов. М.: Медицина, 1977.
13. Bhardwaj S., Gupta D. et al. Study of acute, subacute and chronic toxicity test. *IJARPB* 2012; 2 (2): 103-129.

Biological Activity of New 1-Benzoyl-Substituted 6-(Methylthio)-4-Chloro-1*h*-Pyrazolo[3,4-*D*]Pyrimidines

Ofitserova E. S.

Postgraduate, Chair for Organic Chemistry

Alekseeva L. N.

PhD (Pharmacy)

Shklyarenko A. A.

Postgraduate, Chair for Organic Chemistry

Yakovlev I. P.

Doctor of Chemistry, Professor

St. Petersburg State University of Chemistry and Pharmacy, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

Corresponding Author: Ekaterina S. Ofitserova; **e-mail:** OfizerovaES@mail.ru

Conflict of interest. None declared.

Funding. The study had no sponsorship.

Abstract

The article presents results of the study of the biological activity of newly synthesized 1-benzoyl-substituted-6-(methylthio) -4-chloro-1*H*-pyrazolo [3,4-*d*] pyrimidines. The acute toxicity of 2-aryl-6- (methylthio) -4-chloro-2*H*-pyrazolo [3,4-*d*] pyrimidines was determined experimentally on non-linear white male mice with a total weight of 16-20 g. A generation model was used to experimentally evaluate the analgesic activity acetic "writhing" in mice. It was experimentally confirmed that the synthesized new 2-aryl-6- (methylthio) -4-chloro-2*H*-pyrazolo [3,4-*d*] pyrimidines are non-toxic and have pronounced analgesic activity.

Keywords: 1-Benzoyl-Substituted 6-(Methylthio)-4-Chloro-1*h*-Pyrazolo[3,4-*D*]Pyrimidines, biologic activity, PASS program, acute toxicity, analgesic activity

References

1. Chauhan M., Kumar R. Medicinal attributes of pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidines: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2013. doi: 10.1016/j.bmc.2013.07.027
2. Rashad A.E., Hegab M.I., Abdel-Megeid R.E. et al. Synthesis and anti-HSV-1 evaluation of some pyrazoles and fused pyrazolopyrimidines *Eur. J. Med. Chem.* 2009; 44: 3285. doi:10.1016/j.ejmech.2009.02.012
3. Rashad A.E., Hegab M.I., Abdel-Megeid R.E. et al. Synthesis and antiviral evaluation of some new pyrazole and fused pyrazolopyrimidine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 2008; 16: 7102. doi:10.1016/j.bmc.2008.06.054
4. Holla B.S., Mahalinga M., Karthikeyan M.S. et al. Synthesis of some novel pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine derivatives as potential antimicrobial agents. *Bioorg. Med. Chem.* 2006; 14: 2040. doi:10.1016/j.bmc.2005.10.053
5. Bakavoli M., Bagherzadeh G., Vaseghifar M. et al. Molecular iodine promoted synthesis of new pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine derivatives as potential antibacterial agents. *Eur. J. Med. Chem.* 2010; 45: 647. doi: 10.1016/j.ejmech.2009.10.051
6. Trivedi A.R., Dholariya B.H. et al. Synthesis and anti-tubercular evaluation of some novel pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine derivatives. *Med Chem Res.* 2012; 21:1887–1891. doi: 10.1007/s00044-011-9712-3

7. Rzeski W., Matysiak J., Kandefer-Szerszen M. Anticancer, neuroprotective activities and computational studies of 2-amino-1,3,4-thiadiazole based compound. *Bioorg. Med. Chem.* 2007; 15: 3201. doi: 10.1016/j.bmc.2007.02.041
8. Mavrova A.T., Wesselinova D., Tsenov Y.A., et al. Synthesis, cytotoxicity and effects of some 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives on immunocompetent cells. *Eur. J. Med. Chem.* 2009; 44: 63. doi: 10.1016/j.ejmech.2008.03.006
9. Tamta H. et al. Biochemical characterization of some pyrazolopyrimidine based inhibitors of xanthine. *Biochemistry (Moscow)* 2006; 71: S49-S54. doi: 10.1134/S0006297906130086
10. Pat. RU2708892 Rossijskaya Federaciya MPK A 61 K 31/519 Proizvodnye 1h-pyrazolo [3,4-d] pyrimidine I sposob ikh polucheniya. Ofitserova E.S., Shklyarenko A.A., Ovsyannikova L.N., Yakovlev I.P.; заявитель i patentoobladatel' FGBOU VO SPKHFA Minzdrava Rossii. [Pat. RU2708892 Russian Federation, IPC A 61 K 31/519 Derivatives of 1h-pyrazolo [3,4-d] pyrimidine and method of their production. Ofitserova E.S., Shklyarenko A.A., Ovsyannikova L.N., Yakovlev I.P.; applicant and patentee FGBOU VO SPKHFA Minzdrava Rossii]; declared 03.04.2017; published 19.12.2017. (In Russ.).
11. Prozorovskiy V.B. Statisticheskaya obrabotka rezul'tatov farmakologicheskikh issledovanij. [Statistic processing of data of pharmacological investigations.] *Psihofarmakologiya i biologicheskaya narkologiya [Psychopharmacology and Biological Narcology]* 2007; 7 (3-4): 2090-2120. (In Russ.).
12. Izmerov I.F., Sanotsky I.V., Sidorov K.K. Parametry toksikometrii promyshlennyh yadov. [Toxicometric parameters of industrial poisons.] Moscow: Medicine, 1977. (In Russ.).
13. Bhardwaj S., Gupta D. et al. Study of acute, sub acute and chronic toxicity test. *IJARP* 2012; 2 (2): 103-129.